



УДК 547.952/953

СИНТЕЗ ЦЕРАМИД-1-ФОСФАТОВ

*Бушнев А. С., Карпышев Н. Н., Звонкова Е. Н.,
Евстигнеева Р. П.*

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Осуществлен синтез церамид-1-фосфатов, различающихся набором сфингозиновых оснований, путем фосфорилирования 3-бензоилцерамидов с помощью дихлорангидрида β, β -трихлорэтилфосфорной кислоты в пиридине с последующим удалением защитных групп нагреванием с цинком в уксусной кислоте и пиридине и обработкой метанольным раствором метилата натрия.

Среди промежуточных соединений биосинтеза фосфорсодержащих сфинголипидов микроорганизмов ключевую роль отводят церамид-1-фосфатам [1]. Предполагают, что эти соединения являются предшественниками цитидиндифосфоцерамидов, которые принимают участие в синтезе церамидфосфоглицеринов, церамидфосфосеринов и, возможно, других сложных сфингофосфолипидов [2, 3].

Для подтверждения этой гипотезы и выявления деталей механизма метаболических превращений весьма полезными могут быть индивидуальные

Таблица 1

Свойства синтезированных соединений

Соединение	Брутто-формула *	R	Конфигурация	Выход, %	Т. пл. ^{2*} , °C	R _f (система)	[α] _D ²⁰ (с, растворитель)
(Ia)	C ₃₆ H ₇₂ NO ₆ PNa ₂	C ₁₅ H ₃₁	<i>DL-эритро</i>	75,4	167–169 (а)	0,40 (А)	—
(Iб)	C ₃₆ H ₇₂ NO ₆ PNa ₂	C ₁₅ H ₃₁	<i>D-эритро</i>	76,7	209–212	0,40 (А)	—
(Iв)	C ₃₆ H ₇₂ NO ₆ PNa ₂	C ₁₅ H ₃₁	<i>DL-трео</i>	78,5	175–176	0,43 (А)	—
(Iг)	C ₃₆ H ₇₀ NO ₆ PNa ₂	C ₁₃ H ₂₇ CH=CH	<i>DL-эритро</i>	90,0	180–182 (б)	0,40 (А)	—
(IIa)	C ₄₅ H ₇₉ NO ₇ PCl ₃	C ₁₅ H ₃₁	<i>DL-эритро</i>	92,0	72–74 (в)	0,40 (Б)	—
(IIб)	C ₄₅ H ₇₉ NO ₇ PCl ₃	C ₁₅ H ₃₁	<i>D-эритро</i>	83,0	70–71 (в)	0,40 (Б)	–5,3° (1, CHCl ₃)
(IIв)	C ₄₅ H ₇₉ NO ₇ PCl ₃	C ₁₅ H ₃₁	<i>DL-трео</i>	77,0	60–61 (в)	0,40 (Б)	—
(IIг)	C ₄₅ H ₇₇ NO ₇ PCl ₃	C ₁₃ H ₂₇ CH=CH	<i>DL-эритро</i>	85,0	65–66 (в)	0,40 (Б)	—
(IVa)	—	C ₁₅ H ₃₁	<i>DL-эритро</i>	87,0	72–73,5 (г) ^{3*}	0,30 (В)	—
(IVб)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	C ₁₅ H ₃₁	<i>D-эритро</i>	88,8	83–84 (г)	0,30 (В)	–5,7° (1, CHCl ₃)
(IVв)	C ₄₃ H ₇₈ NO ₇ P	C ₁₅ H ₃₁	<i>DL-трео</i>	90,1	58–59,5 (д)	0,33 (В)	—
(IVг)	C ₄₃ H ₇₆ NO ₇ P	C ₁₃ H ₂₇ CH=CH	<i>DL-эритро</i>	78,0	69–70 (в) ^{4*}	0,30 (В)	—

* Элементный анализ полученных соединений соответствовал рассчитанному.

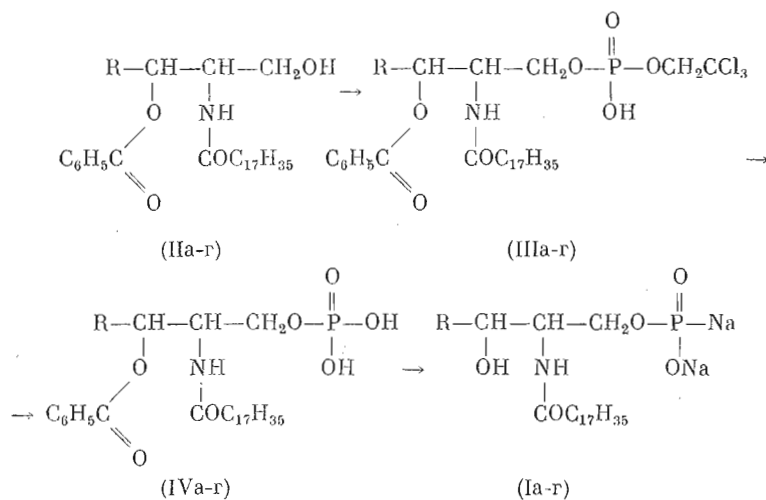
^{2*} В скобках указан растворитель: а) этилацетат; б) эфир — метанол, 3:2; в) эфир — ацетон; г) хлороформ — метанол; д) ацетон.

^{3*} Лит. данные: т. пл. 72–74° С [5].

^{4*} Аммониевая соль (IV г) получена с выходом 85% и т. пл. 123–125° С.

образцы как керамид-1-фосфатов природного строения, так и структурных аналогов. Известный способ их препаративного получения заключается в ферментативном гидролизе сфингомиелинов под действием сфингомиелиназы, принадлежащей к группе фосфолипаз D из *Corynebacterium ovis* [4].

В настоящей работе на примере получения керамид-1-фосфатов (Ia-г) (см. схему и табл. 1) нами предложен метод химического синтеза этих соединений, ключевым моментом которого является превращение доступных 3-бензоилцерамидов (IIa-г) в соответствующие 3-бензоилцерамид-1-фосфаты (IVa-г) с последующим удалением защитной бензоильной группировки при $S_{\alpha 2}$ молекулы церамида действием метанольного раствора метилата натрия.



Значения R—см. табл. 1.

В нашей лаборатории 3-бензоилцерамид-1-фосфаты (IV) были применены ранее для синтеза некоторых сфингофосфолипидов [5–8], причем для приготовления самих 3-бензоилцерамид-1-фосфатов из 3-бензоилцерамидов мы пользовались в качестве фосфорилирующих агентов хлорокисью фосфора, фенилдихлорфосфатом, 2-хлорметил-4-нитрофенилдихлорфосфатом и бис(β,β,β-трихлорэтил)хлорфосфатом [5, 6, 9, 10]. Однако использование хлорокиси фосфора приводит к образованию заметных количеств побочных симметричных диэфиров фосфорной кислоты, что не только снижает выход искомым моноэфиров, но и затрудняет их выделение из реакционной смеси. Применение фенилдихлорфосфата требует последующего гидрогенолиза для удаления защитной фенильной группы, что неприемлемо при получении ненасыщенных соединений. При фосфорилировании с помощью 2-хлорметил-4-нитрофенилдихлорфосфата требуется тщательная хроматографическая очистка продуктов реакции от окрашенных веществ. Наконец, при использовании бис(β,β,β-трихлорэтил)фосфорилхлорида для фосфорилирования 3-бензоилцерамидов, которые являются по своей природе амидоспиртами, в результате реакции образуются неустойчивые фосфотриэфиры, легко превращающиеся в процессе выделения или при удалении защитной группы в соответствующие оксазолины [6, 11].

По нашему мнению, перечисленных недостатков лишен дихлорангидрид β,β,β-трихлорэтилфосфорной кислоты, известный в качестве фосфорилирующего агента в химии нуклеотидов [12, 13] и предложенный нами для синтеза фосфолипидов [14]. Этот реагент представляет собой мовозамещенный хлорангидрид фосфорной кислоты и тем самым способствует селективному протеканию реакции фосфорилирования с образованием с высокими выходами соответствующих устойчивых фосфодиэфиров. Кроме того, удаление защитной трихлорэтильной группировки в мягких условиях

ИК-спектры синтезированных соединений

Соединение	Полосы поглощения
(Ia)	3300 с, 1650 с, 1550 с, 1245 сл, 1070 с, шир., 960 сл, 865 сл
(Iб)	3300 с, шир., 1650 с, 1560 с, 1280 сл, 1100 с, 1000 с, 820 ср
(Iв)	3400 с, 3250 шир., 1630 с, 1550 с, 1270 сл, 1100 с, 990 с, 810 ср
(Iг)	3280 с, шир., 1645 с, 1560 с, 1265 сл, 1100 с, шир., 980 с, 820 сл
(IIIa)	3340 с, 3060 сл, 1720 с, 1650 с, 1550 с, 1275 с, 1180 сл, 1120 с, 1080 ср, 1040 ср, 950 сл, 890 ср
(IIIб)	3300 с, шир., 1720 с, 1650 с, 1550 с, 1275 с, 1180 сл, 1115 с, 1075 сл, 1035 сл, 950 сл, 890 сл
(IIIв)	3280 с, 3080 сл, 1735 с, 1650 с, 1560 с, 1270 с, 1190 сл, 1120 с, 1030 с, 900 ср, 770 ср
(IIIг)	3300 с, 1720 с, 1650 с, 1540 с, 1270 с, 1180 сл, 1115 с, 1035 ср, 970 ср, 890 ср
(IVa)	3300 с, 3060 сл, 1730 с, 1650 с, 1555 с, 1275 с, 1210 сл, 1120 с, 1070 с, 1035 с, 985 сл
(IVб)	3300 с, 1710 с, 1645 с, 1545 с, 1270 с, 1180 сл, 1120 с, 1075 ср, 1025 с, 830 сл
(IVв)	3300 с, 3080 сл, 1730 с, 1650 с, 1550 с, 1280 с, 1180 сл, 1120 с, 1050 с, шир., 940 ср, 820 сл
(IVг)	3320 с, 1730 с, 1700 сл, 1650 с, 1560 с, 1285 с, 1250 ср, 1180 с, 1130 сл, 1060 с, 965 с, 845 ср

(цинком в уксусной кислоте и пиридине) не затрагивает ни сложноэфирной, ни амидной групп и не сопровождается восстановлением двойных связей в случае ненасыщенных соединений.

По выбранному нами методу [14] 3-бензоилцерамиды (II а — г) обрабатывали 4–5-кратным избытком фосфорилирующего агента в хлороформе в качестве растворителя в присутствии избытка пиридина при температуре от -15 до -20°C в течение 30–45 мин, чтобы избежать разложения промежуточных хлорфосфатов [9] и обеспечить полноту фосфорилирования. Образующиеся диэферы (III а — г) удалось выделить с высокими выходами путем кристаллизации из смеси эфир — ацетон в виде свободных кислот или аммониевых солей без дополнительной хроматографической очистки. Последующее удаление защитных β, β, β -трихлорэтильных групп в диэфирах (III а — г) цинковой пылью в смеси пиридин — уксусная кислота привело с высокими выходами к 3-бензоилцерамид-1-фосфатам (IV а — г). Последние обработкой раствором метилата натрия в смеси хлороформ — метанол были превращены в церамид-1-фосфаты (I а — г), выделенные нами в виде динатриевых солей, чтобы избежать $\text{N} \rightarrow \text{O}$ -ацильной миграции, возможной в результате кислотного автокатализа под действием свободной фосфатной функции.

Структура синтезированных соединений была подтверждена данными ИК-спектроскопии (см. табл. 2), а в случае не описанных ранее веществ — также и данными элементного анализа. Свойства полученных фосфатов приведены в табл. 1.

Экспериментальная часть

ИК-спектры сняты на спектрофотометре Perkin-Elmer 257 в вазелиновом масле. Углы вращения измеряли на спектрофотополяриметре Perkin-Elmer 241МС. ТСХ осуществляли на пластинках с силикагелем фирмы Merck (ФРГ) в системах хлороформ — метанол — уксусная кислота — вода, 60 : 20 : 6 : 1 (А), 160 : 20 : 6 : 1 (Б), 120 : 20 : 6 : 1 (В); обнаружение проводили раствором молибдата аммония в разбавленной серной кислоте и последующим нагреванием при $\sim 100^{\circ}\text{C}$ для идентификации фосфорсодержащих компонентов смесей, а затем прокаливанием при $200\text{--}250^{\circ}\text{C}$.

3-Бензоил-1-(β,β,β -трихлорэтил)фосфоцерамиды (III а - г). К раствору 4,0 г β,β,β -трихлорэтилфосфодихлорида [15] и 5 мл пиридина в 40 мл хлороформа при перемешивании и охлаждении до $-15-20^{\circ}\text{C}$ в течение 30-40 мин прибавляли по каплям раствор 2,0 г 3-бензоилцерамида (II а - г) в 60 мл хлороформа. Через 15 мин к реакционной массе прибавляли 20 мл смеси вода - пиридин (1 : 1), перемешивали 1 ч при $20-22^{\circ}\text{C}$, после чего разбавляли 400 мл хлороформа, промывали разбавленной соляной кислотой (1 : 10), водой, упаривали в вакууме, остаток растворяли в минимальном количестве эфира и разбавляли ацетоном, осадок отфильтровывали, получали фосфоциамид (III а - г) (см. табл. 1).

3-Бензоилцерамид-1-фосфаты (IV а - г). Раствор 1,2 г диэфира (III а - г) в 45 мл ледяной уксусной кислоты и 18 мл пиридина перемешивали 6-7 ч при $65-70^{\circ}\text{C}$ с 6 г цинковой пыли. Осадок отделяли, тщательно промывали на фильтре уксусной кислотой, фильтрат разбавляли хлороформом до объема 400 мл, промывали разбавленной соляной кислотой (1 : 10), водой, упаривали в вакууме, остаток растворяли в минимальном количестве эфира и разбавляли ацетоном или смесью ацетона с небольшим количеством 25%-ного аммиака, осадок отфильтровывали, получали замещенный церамид-1-фосфат (IV а - г) (см. табл. 1).

Церамид-1-фосфаты (I а - г). 0,4 г 3-бензоилцерамид-1-фосфата (IV а - г) растворяли в 16 мл смеси хлороформ - метанол - 2 н. раствор метилата натрия в метаноле (5 : 5 : 1), выдерживали 2 ч при $20-22^{\circ}\text{C}$, прибавляли 20 мл воды, осадок отфильтровывали, тщательно промывали водой, затем ацетоном, получали церамид-1-фосфат (I а - г) (см. табл. 1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Schneider E. G., Kennedy E. P. (1973) J. Biol. Chem., 248, 3739-3741.
2. Rizza V., Tucker A. N., White D. C. (1970) J. Bacteriol., 101, 84-91.
3. Schneider E. G., Kennedy E. P. (1976) Biochim. et biophys. acta, 441, 294-301.
4. Souček A., Michalec C., Součková A. (1971) Biochim. et biophys. acta, 227, 116-128.
5. Bushnev A. S., Zvonkova E. N., Evstigneeva R. P. (1975) Chem. Phys. Lipids, 14, 263-267.
6. Звонкова Е. Н., Мицнер Б. И., Бушнев А. С., Орлова Е. Г., Крушна Габор, Маркина Н. Н., Талагаева С. В., Евстигнеева Р. П. (1975) Биоорган. химия, 1, 1746-1754.
7. Бушнев А. С., Карпышев Н. Н., Ульяшин В. В., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1979) Биоорган. химия, 5, 234-237.
8. Карпышев Н. Н., Бушнев А. С., Полстянов А. Е., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1979) Биоорган. химия, 5, 238-241.
9. Звонкова Е. Н., Бушнев А. С., Мицнер Б. И., Евстигнеева Р. П. (1973) Ж. орган. химии, 9, 31-35.
10. Evstigneeva R. P., Zvonkova E. N. (1976) Revista Ital. Sos. Grasse, 53, 229-233.
11. Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1971) Ж. орган. химии, 7, 2313-2316.
12. Eckstein F., Rizk J. (1967) Angew. Chem., 79, 939.
13. Eckstein F., Rizk J. (1969) Chem. Ber., 102, 2362-2377.
14. Бушнев А. С., Звонкова Е. Н., Евстигнеева Р. П. (1978) Авт. свид. СССР № 598905. Бюлл. изобр., № 11, 1978.
15. Owen G. R., Reese C. V., Ransom C. J., van Boom J. H., Herscheid J. D. H. (1974) Synthesis, 704-705.

Поступила в редакцию
7.II.1979

THE SYNTHESIS OF CERAMIDE-1-PHOSPHATE

BUSHNEV A. S., KARPYSHEV N. N., ZVONKOVA E. N.,
EVSTIGNEEVA R. P.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

The synthesis of ceramide-1-phosphates differing in sphingosine base composition has been carried out. It involves phosphorylation of 3-benzoylceraimides with β,β,β -trichloroethylphosphodichloride in pyridine followed by heating with zinc dust in acetic acid-pyridine mixture and treatment with sodium methylate in methanol.